

Utilisation du moustique pour la multiplication des arbovirus

Jean COZ *

Michel VALADE **

Michel CORNET ***

Marie-Odile LEMOINE ***

André LORAND **

RÉSUMÉ.

Chez le moustique, il est souvent difficile de mettre en évidence de petites quantités d'arbovirus. La méthode classique consiste en l'inoculation de moustiques broyés à des souriceaux. Malheureusement, ces derniers ne sont pas très sensibles.

Nous avons utilisé la technique de Rosen et Gubler pour multiplier le virus amaril : elle consiste en l'inoculation à des Aedes vivants de suspensions de virus puis, après un certain temps, en l'inoculation du broyat de ces moustiques à des souriceaux. Nous avons déterminé la valeur de la méthode qui est beaucoup plus sensible que l'inoculation directe au souriceau. Elle nous a de plus permis d'isoler quelques souches d'arbovirus notamment de virus Chikungunya et Ndumu (Alphaviridae) qui ne l'avaient pas été par la méthode directe classique.

MOTS CLÉS : arbovirus – inoculation – *Aedes*.

ABSTRACT.

It is often difficult to show up small amounts of arboviruses in mosquitoes. Classical method consists in inoculating a grinded pool of mosquitos to suckling mice. Unhappily the last ones are not very sensitive.

We have used Rosen and Gubler technic to multiply yellow fever virus; it consists of inoculation to living Aedes of virus suspension then after a certain time the grinded infected mosquitoes are inoculated to suckling mice. More, it has allowed to isolate some virus strains which have not been isolated by classical method : two Chikungunya virus strains and two Ndumu strains (Alphaviridae).

KEY WORDS : arbovirus – inoculation – *Aedes*.

INTRODUCTION.

L'inoculation intracérébrale ou intrapéritonéale au souriceau nouveau-né est la technique de routine la plus utilisée pour l'isolement des arbovirus à partir de broyats de moustiques. La présence d'un virus est signalée par l'apparition de symptômes paralytiques qui entraînent en général la mort (Sudia et Chamberlain, 1967).

Si cette technique se révèle excellente dans la majorité des cas, elle présente de sérieux inconvénients lorsque

la dose de virus contenue dans l'inoculum est trop faible. Le souriceau peut ne pas recevoir assez de virus et ne pas être malade ou présenter des signes parétiques transitoires et guérir. Il est également fréquent que les mères dévorent les souriceaux malades, surtout quand il n'y en a que peu d'atteints.

Nos recherches sur le virus amaril dans la région de Kédougou, au Sénégal oriental, semblent montrer que le virus amaril y a circulé chaque année avec plus ou moins d'intensité de 1970 à 1975 (Taufflieb *et al.*, 1973,

* Entomologiste médical O.R.S.T.O.M., 70-74, route d'Aulnay, 93140 Bondy.

** Technicien O.R.S.T.O.M., Dakar.

*** Technicienne de l'Institut Pasteur de Dakar.

**** Entomologiste médical O.R.S.T.O.M., Institut Pasteur O.R.S.T.O.M., B.P. 220, Dakar, Sénégal.

obs. pers.); cette opinion est basée sur l'examen sérologique des singes et des enfants non vaccinés. Or, au cours de cette période et malgré un nombre important d'inoculations, aucune souche de virus amaril n'a pu être isolée, ni de vertébrés, ni de moustiques. Par contre de nombreux autres virus ont pu être isolés. Une hypothèse pour expliquer ce fait est le manque de sensibilité du souriceau au virus amaril, le moustique infecté ne contenant pas assez de virus pour tuer les souriceaux inoculés. A l'appui de cette hypothèse, remarquons qu'aucune des 6 souches de virus amaril récemment isolé de République Centrafricaine (Germain *et al.*, 1976) n'a tué la totalité des souriceaux inoculés, la mortalité ayant été de 13 % à 58 %.

Il convient donc de chercher une technique d'isolement plus sensible. Une solution consisterait à augmenter pour chaque broyat le nombre de souriceaux inoculés; ceci est difficilement réalisable dans une enquête systématique où le nombre de broyats à tester est trop élevé. Une autre technique consisterait à obtenir la multiplication du virus avant l'inoculation au souriceau.

Confrontés au même problème avec le virus de la dengue, Rosen & Gubler (1974) ont montré que l'inoculation parentérale de suspension du virus à *Aedes albopictus* permettait un enrichissement et rendait ainsi possible la détection de faibles doses de virus.

Nous avons donc testé la technique de Rosen et Gubler en laboratoire avec *Aedes aegypti* et le virus amaril. Dans un premier temps nous avons utilisé des suspensions de virus amaril de titre faible, obtenus à partir de cerveaux de souriceaux infectés. Les résultats s'étant montrés prometteurs, nous avons commencé l'emploi de cette technique pour les lots de moustiques récoltés dans la nature et pour lesquels l'inoculation directe au souriceau laissait soupçonner la présence d'arbovirus sans que ce virus ait pu être isolé.

1. TECHNIQUE.

Matériel utilisé :

- aiguilles de verre;
- porte-aiguille métallique;
- seringue de 50 ml;
- robinet à trois voies;
- tubes souple en caoutchouc.

La technique est bien décrite dans l'article de Rosen et Gubler (*Ibid.*); nous nous contenterons d'insister sur certains détails.

1.1. Aiguilles de verre.

Elles sont préparées à partir de tubes capillaires en verre de diamètres interne et externe connus; nous utilisons des tubes du commerce destinés à la prise d'une microquantité de sang. Ces tubes sont tout d'abord étirés

légèrement dans la veilleuse d'un bec Bunsen; l'étirement est ensuite terminé en présentant l'étranglement obtenu à quelques distance au-dessus de la veilleuse (2-3 cm) et en tirant d'un coup sec. Ceci permet d'obtenir des pointes suffisamment fines mais pas trop longues toutefois. La longueur de la pointe de l'aiguille joue un rôle important au moment de l'injection au moustique; une pointe longue se casse facilement, elle est de plus, difficile à manipuler sous le microscope stéréoscopique. Les aiguilles sont ensuite graduées à l'encre de chine, par millimètre sous la loupe; 1 mm correspondant à 0,26 microlitre.

1.2. Les moustiques.

Les moustiques appartiennent à une souche d'*Ae. aegypti* originaire du Sénégal et maintenue depuis quelque années en insectarium. Les femelles (4-5 jours), gorgées de la veille sont anesthésiées par passage dans un congélateur à -20°C (1 minute) puis placées sur une table froide (Sudia et Chamberlain). Les moustiques sont placés sur le dos et l'inoculation est pratiquée en piquant l'aiguille dans la membrane réunissant la tête au prothorax. Les moustiques sont ensuite placés à température de $28-29^{\circ}\text{C}$ où ils sont maintenus une dizaine de jours.

La piqure de l'insecte est effectuée à un grossissement moyen du microscope stéréoscopique; l'injection proprement dite au petit grossissement. L'aiguille qui est présentée obliquement au moment de la piqure est relevée avec le moustique, placée parallèlement à la table pour suivre l'écoulement du liquide, ceci permet de ne pas avoir à modifier la mise au point du microscope stéréoscopique. L'injection doit se faire lentement ce qui permet une bonne pénétration du liquide et évite les remontées le long de l'aiguille.

1.3. Solution de virus.

Elle est préparée avec des cerveaux de souriceaux préalablement infectés avec du virus amaril (SH 1296) provenant d'un malade de l'épidémie de Diourbel (Sénégal 1965). Les cerveaux sont broyés et dilués dans un tampon phosphaté jusqu'à obtenir la concentration voulue. Les solutions de virus sont d'une part injectée directement à des lots de souriceaux, d'autre part à des moustiques qui après une dizaine de jours sont broyés et inoculés individuellement à des lots de souriceaux.

2. RÉSULTATS.

D'une part nous avons le nombre de souriceaux paralysés ou morts après inoculation intracérébrale directe, d'autre part les lots de souriceaux paralysés ou tués par les moustiques inoculés.

Pour comparer les deux méthodes nous avons admis qu'une unité infectieuse correspondait à :

- un souriceau positif par inoculation directe;
- un lot de souriceaux positifs pour les moustiques inoculés.

2.1. Solution virale au $1/8^e$ DL50 souriceau dans 0,02 millilitre.

— Inoculation directe : 6 souriceaux positifs sur 51 testés, ce qui correspond à 6 unités infectieuses pour 1 020 microlitres ($51 \times 0,02$ ml).

— Enrichissement : 2 moustiques positifs sur 49 testés, ce qui représente 2 unités infectieuses pour 12,74 microlitres inoculés. Le passage sur moustique révèle donc 26,7 fois plus d'unités infectieuses que les souriceaux infectés directement.

2.2. Solution virale au $1/16^e$ DL50 souriceau dans 0,02 millilitre.

— Inoculation directe : 2 souriceaux positifs sur 110 testés représentant 2 unités infectieuses pour 2 200 microlitres.

— Enrichissement : 4 moustiques positifs sur 108 testés représentant 4 unités infectieuses pour 48,6 microlitres inoculés.

Au $1/16^e$ DL50 les moustiques révèlent 90,5 fois plus d'unités infectieuses que les souriceaux infectés directement.

3. ÉTUDE DU TEMPS DE MISE EN OBSERVATION POUR LES MOUSTIQUES.

Le choix du temps d'observation doit tenir compte des deux facteurs suivants : d'une part la mortalité des moustiques inoculés, d'autre part la vitesse de multiplication des virus.

3.1. Mortalité des moustiques inoculés.

Dans la série d'expériences précédentes nous avons effectué nos recherches sur le moustique inoculé, après 10 jours de mise en observation à 28-29 °C. Il est évident que la mortalité au cours de ces dix jours est assez importante. Il faut donc inoculer un grand nombre de moustiques d'autant plus d'ailleurs que le temps de latence est plus important.

Nous avons relevé les mortalités journalières après inoculation de 0,26 microlitre de broyat de moustiques dans une solution tamponnée sur 2 132 femelles d'*Ae. aegypti* (voir fig. 1).

Nous avons pu observer qu'au jour 3 il y avait 76 % de survivants, à J 6 : 64 %, à J 9 : 50 %, à J 12 : 29 %.

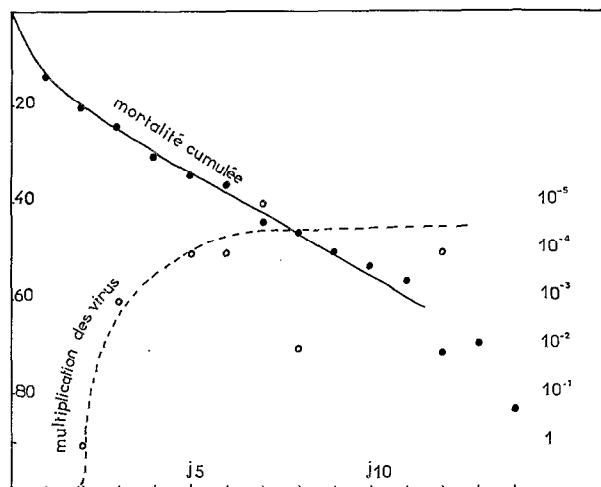


FIG. 1. — Etudes de la mortalité journalière chez les *Ae. aegypti* inoculés et du taux de multiplication des virus. En abscisse : nombre de jours après l'inoculation. En ordonnée : à gauche, mortalité cumulée %; à droite, dilutions du broyat de moustiques où le virus est mis en évidence.

3.2. Multiplication des virus dans l'insecte.

Nous avons inoculé une série d'*Ae. aegypti* avec 0,26 microlitre d'une suspension contenant 0,5 DL50 souriceau de fièvre jaune (SH 1296) dans 0,02 ml intra-cérébral.

Jour après jour, les moustiques ont été prélevés par lot de dix, écrasés dans 1 ml de tampon phosphaté et inoculés, purs, dilués à 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} .

- à J 0 et J 1, le virus est indécélable sur souriceau,
- à J 2, suspension pure positive,
- à J 3, dilution à 10^{-3} positive,
- à J 5, dilution à 10^{-4} positive,
- à J 6, dilution à 10^{-3} positive,
- à J 7, dilution à 10^{-5} positive,
- à J 8, dilution à 10^{-2} positive,
- à J 12, dilution à 10^{-4} positive.

On peut admettre qu'à partir de J 5, la quantité de virus n'augmente plus, ce qui laisse encore 65 % de survie sur les insectes inoculés; il suffit donc de garder les moustiques inoculés quatre ou cinq jours à 28-29 °C. Après ce laps de temps il reste encore de 65 à 70 % de survivants; ceci permet de ne pas inoculer de lots de moustiques trop importants.

Nous proposons en enquête systématique à partir des lots de moustiques sauvages (50-100) d'inoculer des lots de 30 *Ae. aegypti*; ces moustiques seront sacrifiés à J 5, broyés dans 1 millilitre de solution tampon et inoculés au souriceau.

4. APPLICATION DE LA MÉTHODE.

Nous avons appliqué la méthode d'enrichissement sur moustique à l'enquête sur les vecteurs d'arboviroses menée au Sénégal oriental. C'est ainsi que nous avons obtenu l'isolement supplémentaire de deux souches de Chikungunya (Alphavirus) à partir de deux lots d'*Aedes furcifer taylori* en 1975; l'inoculation directe avait permis l'isolement de 36 souches de ce même virus. De plus l'inoculation à *Ae. aegypti* de broyats d'*Aedes dalzeli* suspects a mis en évidence deux souches de virus Ndumu (Alphavirus).

Manuscrit reçu au Service des Publications le 3 mars 1977.

BIBLIOGRAPHIE

- COZ (J.), LE GONIDEC (G.), CORNET (M.), VALADE (M.), LEMOINE (M. O.) et GUEYE (A.), 1975. — Transmission expérimentale d'un arbovirus du groupe B le virus Koutango par *Aedes aegypti* (L.). *Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol.*, vol. XIII, n° 2 : 57-62.
- GERMAIN (M.), SUREAU (P.), HERVÉ (J. P.), FABRE (J.), MOUCHET (J.), ROBIN (Y.) et GEOFFROY (B.), 1976. — Isollements du virus de la fièvre jaune à partir d'*Aedes* du groupe *africanus* (Theobald) en République Centrafricaine. Importance des savanes humides et semi-humides en tant que zone d'émergence du virus amaril. *Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol.*, vol. XIV, n° 2 : 125-139.
- ROSEN (L.) and GUBLER (D.), 1974. — The use of mosquitoes to detect and propagate Dengue viruses. *Ann. J. Trop. Med. Hyg.*, 23 : 1153-1160.
- SUDIA (W. D.), CHAMBERLAIN (R. W.) and COLLIER (M.), 1965. — The CDC entomological chill table, a refrigerated unit for use in processing mosquitoes for virus isolation studies. *Mosq. New*, 25 : 385-389.
- SUDIA (W. D.) et CHAMBERLAIN (R. W.), 1967. — Collection and processing of medically important arthropods for virus isolation. U.S. Department of Health, Education and Welfare, Public Health Service, Bureau of Disease Prevention and Environmental Control. National Communicable Disease Center, Atlanta, Georgia 30333, 29 p.
- TAUFFLIEB (R.), CORNET (M.), LE GONIDEC (G.) et ROBIN (Y.), 1973. — Un foyer selvatique de fièvre jaune au Sénégal Oriental. *Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol.*, vol. XI, n° 3 : 211-220.